

# 転写因子E2F1のN末端領域と相互作用する新規候補 因子WDR1の機能解析

著者	藤原 悠人
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10236/00028922">http://hdl.handle.net/10236/00028922</a>

# 転写因子 E2F1 の N末端領域と相互作用する新規候補因子 WDR1の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科

生命医化学専攻 大谷研究室 藤原悠人

【研究目的】 転写因子 E2F は、休止期においてがん抑制因子 pRB の結合により活性が抑制されている。E2F は、増殖刺激による pRB の不活性化により生理的に活性化されると、Cdc6 等の増殖関連遺伝子を活性化し、細胞増殖に中心的な役割を果たす。一方、pRB の欠損や変異などのがん性変化により pRB の制御を外れて活性化されると、がん抑制遺伝子 ARF 等を活性化することでアポトーシスを誘導し、がん化抑制に働く。したがって、がん化抑制には pRB の制御を外れた E2F 活性が重要である。しかし、その活性の制御機構の詳細は明らかにされていない。8 つある E2F ファミリー分子の中で、E2F1 のアポトーシス誘導能が最も高く、がん化抑制に最も重要である。先行研究において、E2F1 の DNA 結合領域および転写活性化領域以外の N 末端領域を欠失すると、ARF 遺伝子の活性化能が著しく低下した。このことから、E2F1 の N 末端領域と相互作用し、標的遺伝子発現に関与する因子の存在が示唆された。そこで Yeast two-hybrid 法を用いて E2F1 の N 末端領域と相互作用する因子が検索され、その一つとして WD repeat-containing protein 1 (WDR1) が同定された。先行研究により、WDR1 を過剰発現させると、E2F1 によるがん抑制遺伝子発現をプロモーター、mRNA、タンパク質レベルで増強することが確認された。一方、内在性の WDR1 が E2F1 によるがん抑制遺伝子発現誘導に貢献しているか否かは確認されていない。そこで本研究は、内在性の WDR1 が E2F1 によるがん抑制遺伝子発現誘導に貢献しているか否かを明らかにし、E2F1 によるがん化抑制機構の解明に貢献することを目的とする。

【実験方法】内在性 WDR1 の E2F1 によるがん抑制遺伝子発現誘導への関与は、WDR1 に対する shRNA を用いて WDR1 をノックダウンすることで検討した。遺伝子導入には、組換えアデノウイルスによる感染を用いた。WDR1 に対する標的配列2箇所を選定し、pSilencer 2.0-U6 に shRNA の配列を挿入した。次に発現カセットを pENTR にサブクローニングし、Gateway 法を用いて pAd/PL-DEST に乗せ換えた。これを 293A 細胞に導入し、組換えアデノウイルスを作成した。粗精製後力価を測定し、大量培養・精製後力価を測定した。それら

を用いて、WDR1 のノックダウンが E2F1 による ARF 遺伝子発現誘導に 及ぼす影響を qRT-PCR で解析した。細胞はヒト正常線維芽細胞 HFF、エフェクターは E2F1 および WDR1 に対する shRNA を発現するアデノウイルスを用い、インターナルコントロールには GAPDH を用いた。

【実験結果と考察】WDR1 に対する shRNA (shWDR1 と称する) を発現する組換えアデノウイルスは、オフターゲット効果を避けるため、2 種類作製した。作製した shWDR1 ウイルスの力価はそれぞれ、 $9.31 \times 10^{10}$ 、 $1.49 \times 10^{11}$  /mL となった。また、同時に調整したコントロールウイルスの力価は  $2.18 \times 10^{11}$  /mL となった。作製した shWDR1 ウイルスをヒト正常線維芽細胞 HFF に感染させ、WDR1 のノックダウン効果を qRT-PCR によって調べたところ、2 種類とも WDR1 の発現が 50% 前後減弱することが確認できた。そこで、内在性の WDR1 をノックダウンすることで E2F1 によるがん抑制遺伝子 ARF の発現誘導が 減弱するか否か、qRT-PCR によって検討した。その結果、WDR1 のノックダウンにより、E2F1 による ARF 遺伝子の発現誘導は 64% 程度に減弱された。したがって、内在性の WDR1 が制御を外れた E2F1 活性に貢献していることが確認された。WDR1 は未だ解析の進んでいない因子で、Cofilin を介してアクチンの脱重合を促進することしか報告されていない。本研究結果より、WDR1 の新たな作用として、転写のコアクチベーターとして働き、制御を外れた E2F1 によるがん抑制遺伝子の活性化に貢献していることが明らかとなった。E2F1 によるアポトーシス誘導に対して貢献しているか否かも検討したが、E2F1 過剰発現によるアポトーシス誘導が再現出来ず、影響を判断出来なかった。